

**PCT**

**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE**  
Bureau international



**DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)**

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>(51) Classification internationale des brevets<sup>6</sup>:</b><br><b>C12Q 1/04, 1/34</b>  |  | <b>A1</b><br><br><b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 99/09207</b><br><br><b>(43) Date de publication internationale:</b> <b>25 février 1999 (25.02.99)</b>   |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> <b>PCT/FR98/01717</b><br><b>(22) Date de dépôt international:</b> <b>31 juillet 1998 (31.07.98)</b><br><br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>97/10635                    20 août 1997 (20.08.97)                    FR<br>98/05269                    20 avril 1998 (20.04.98)                    FR   |  | <b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |
| <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).<br><br><b>(72) Inventeur; et</b><br><b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> ORENGA, Sylvain [FR/FR]; Saint-André, F-01160 Neuville sur Ain (FR).<br><br><b>(74) Mandataire:</b> CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).  |  | <b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i><br><i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>   |
| <b>(54) Title:</b> CULTURE AND IDENTIFICATION MEDIA SPECIFIC OF DIFFERENT SPECIES OF <i>CANDIDA</i> AND ANALYSIS METHODS<br><br><b>(54) Titre:</b> MILIEUX DE CULTURE ET D'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DE DIFFERENTES ESPECES DE <i>CANDIDA</i> ET PROCEDES D'ANALYSE   |  |  |
| <b>(57) Abstract</b><br><br>The invention concerns a culture and identification medium specific of yeasts comprising a chromogenous or fluorogenous substrate, capable of being hydrolyzed by an enzyme of the hexosaminidase and optionally glucosidase group, and/or at least a compound selectively inhibiting the hexosaminidase activity of <i>C. tropicalis</i> , and a method for selectively identifying <i>C. albicans</i> and/or <i>C. tropicalis</i> and/or other <i>Candida</i> , using such a medium. The invention is particularly applicable in the biomedical field and more particularly in bacteriology.  |  |  |
| <b>(57) Abrégé</b><br><br>L'invention concerne un milieu de culture et d'identification spécifique de levures comprenant un substrat chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases et éventuellement des glucosidases, et/ou au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de <i>C. tropicalis</i> , et un procédé pour identifier sélectivement <i>C. albicans</i> et/ou <i>C. tropicalis</i> et/ou d'autres <i>Candida</i> , utilisant un tel milieu. La présente invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic biomédical et plus particulièrement en bactériologie. |  |  |

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                                       |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|---------------------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                    | LS | Lesotho                               | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                   | LT | Lithuanie                             | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France                                     | LU | Luxembourg                            | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon                                      | LV | Lettonie                              | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                | MC | Monaco                                | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                    | MD | République de Moldova                 | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana                                      | MG | Madagascar                            | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée                                     | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce                                      | ML | Mali                                  | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                    | MN | Mongolie                              | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                    | MR | Mauritanie                            | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël                                     | MW | Malawi                                | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                    | MX | Mexique                               | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie                                     | NE | Niger                                 | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon                                      | NL | Pays-Bas                              | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya                                      | NO | Norvège                               | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                               | NZ | Nouvelle-Zélande                      | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne                               |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                        | PT | Portugal                              |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                 | RO | Roumanie                              |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                               | RU | Fédération de Russie                  |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                              | SD | Soudan                                |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                  | SE | Suède                                 |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                    | SG | Singapour                             |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |  |    |                                       |    |                       |

## MILIEUX DE CULTURE ET D'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DE DIFFERENTES ESPECES DE CANDIDA ET PROCEDES D'ANALYSE

La présente invention concerne un milieu de culture et d'identification spécifique de levures et un procédé d'analyse microbiologique pour identifier spécifiquement les levures *Candida albicans* et *Candida tropicalis* et/ou différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*.

L'espèce *C. albicans* est la plus communément isolée à partir d'échantillons cliniques et provoque des infections plus ou moins importantes de la peau, des ongles et des muqueuses chez les individus présentant des défenses immunitaires normales et des infections très sérieuses chez les individus affaiblis et notamment ceux infectés par le Virus de l'Immunodéficiency Humaine (VIH). Selon les études *C. tropicalis* est la deuxième ou troisième espèce en fréquence d'isolement dans les prélèvements d'origine humaine. Il est donc essentiel non seulement de pouvoir détecter très rapidement la présence de ces levures dans des prélèvements, mais également de différencier celles appartenant à l'espèce *C. albicans*, de celles de l'espèce *C. tropicalis*.

Pour cela, il a été proposé ces dernières années de nombreuses techniques pour identifier rapidement les levures *C. albicans*. Le plus grand nombre d'entre elles est basé sur la mise en évidence d'une activité hexosaminidase, c'est-à-dire d'enzymes ayant une activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase ou N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidase ou N-acétyl- $\beta$ -D-mannosaminidase (FR-2 684 110, FR-2 659 982). Néanmoins ces procédés souffrent d'une spécificité réduite vis-à-vis des levures de l'espèce *C. tropicalis*.

Les inventeurs de la présente invention ont découvert qu'en inhibant une activité enzymatique de l'espèce *C. tropicalis*, notamment l'activité hexosaminidase, il était possible de pallier aux inconvénients des tests précités et ainsi d'apporter un moyen d'identification et/ou de différenciation des levures, notamment de *C. albicans* et *C. tropicalis*, rapide et peu coûteux.

Par ailleurs, l'activité enzymatique glucosidase à déjà fait l'objet de recherches par certains documents, comme Casal, M. et Linares, M.J. « Contribution to the study of the enzymatic profiles of yeast organisms with medical interest » Mycopathologie 81,155-159 (1983). Cette activité est positive chez quelques souches de *C. albicans*, *C. tropicalis* et *Candida pseudotropicalis* (appelé aujourd'hui *Candida kefyr*), mais négatives pour les autres *Candida*, par exemple *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*.

Il est donc apparu intéressant d'essayer de cumuler, dans un même milieu, la possibilité de rechercher deux activités enzymatiques différentes, c'est-à-dire hexosaminidase et glucosidase. Or on constate que, dans les milieux selon l'invention, ce cumul permet de différencier plus précisément les *C. albicans* par rapport aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* et par rapport aux autres *Candida*, mais également de différencier les *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*.

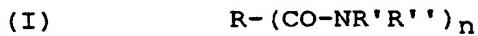
Bien entendu, il est prévu d'associer, dans un même milieu, aux substrats spécifiques des activités hexosaminidase et glucosidase, que l'on recherche, un inhibiteur selon l'invention, et même un activateur de l'activité hexosaminidase.

L'objet de l'invention est donc un milieu de culture et d'identification spécifique de levures comprenant un substrat chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, caractérisé en ce que le milieu comprend en outre au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de *Candida tropicalis*.

Grâce à l'invention, le milieu de culture permet notamment l'identification spécifique des levures de l'espèce *C. albicans* et/ou *C. tropicalis*.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I):

5



dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- 10 - un atome d'hydrogène,  
- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

15 soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

et deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou égal à 1.

20 Selon l'invention, par une chaîne hydrocarbonée "comportant" au moins un hétéroatome, on entend que la chaîne hydrocarbonée peut être substituée par au moins un substituant tel que notamment -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH, et un atome d'halogène, et/ou peut être interrompue par au moins un hétéroatome tel que notamment O, S, et N.

25 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I):

30



dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- 35 - un atome d'hydrogène,  
- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome,

soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

et de deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou 5 égal à 1.

Selon un autre mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I) :

10

(I)  $R-(CO-NR'R'')_n$ 

dans laquelle, premièrement, R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- un atome d'hydrogène,
  - une chaîne hydrocarbonée aliphatique,
- et, deuxièmement, n est égal à 1 ou 2.

Selon un mode de réalisation très préférentiel de l'invention, le composé sélectivement inhibiteur est une acétamide.

20

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend un activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase de *C. albicans*.

25

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase est la N-acétyl-glucosamine.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend un mélange de composés sélectivement inhibiteurs.

30

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le mélange de composés sélectivement inhibiteurs est constitué d'acétamide et de formamide.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu est liquide ou gélifié.

35

Selon un mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture est gélifié et comprend pour 1 litre :

- peptones ou mélange de peptones 0,01-40 g

|   |                           |
|---|---------------------------|
| - extrait de levure                               | 0,01-40 g                 |
| - glucose (source de carbone)                     | 0-10 g                    |
| - tampon phosphate (pH entre 5 et 8,5) 2,5-100 mM |                           |
| - 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-            |                           |
| B-D-glucosaminide                                 | 20-600.10 <sup>-6</sup> M |
| - acétamide                                       | 0,01-20 g                 |
| - inhibiteur de bactéries                         | 0-20 g                    |
| - agar  | 11-20 g                   |

5

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture gélifié ou liquide décrit ci-dessus comprend de plus de la N-acétyl-glucosamine à 1,0 g/l.

10

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture gélifié ou liquide décrit ci-dessus comprend de plus de la formamide à 0,5 g/l.

15

Un autre objet de l'invention est un procédé d'analyse microbiologique pour identifier sélectivement les levures *C. albicans* et/ou *C. tropicalis* et/ou différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*, caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon à analyser au contact d'au moins un milieu d'identification décrit ci-dessus.

20

A cet effet la présente invention concerne également un milieu pour la détection et l'identification spécifique de levures, qui est caractérisé par le fait qu'il comprend deux substrats, un premier substrat, chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, et un second substrat, chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des glucosidases.

25

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, dans ce milieu, chaque substrat est constitué d'une partie spécifique de l'enzyme et d'une partie marqueur, caractérisé par le fait que la partie marqueur du premier substrat est différente de la partie marqueur du second substrat.

30

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le milieu comprend un activateur et/ou un inhibiteur d'hexosaminidase.

5 Dans le cas où il y a un activateur et/ou un inhibiteur, cet activiteur est constitué par une hexosamine et/ou une hexosaminidine et cet inhibiteur reprend les caractéristiques décrites ci-dessus.

10 Selon encore un autre mode préféré de réalisation de l'invention, le substrat d'hexosaminidinase est constitué par un dérivé d'indoxyl et/ou le substrat de glucosidase est constitué par un dérivé d'indoxyl.

Dans tous les cas de figure, le milieu est liquide ou gélifié.

15 La présente invention concerne encore un procédé d'analyse microbiologique pour détecter et identifier sélectivement certaines espèces de levures *Candida*, qui est caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon en contact avec un milieu selon l'une quelconque des revendications 13 ou 18, que l'on attend que des colorations apparaissent dans le milieu et que l'on identifie, par des différences de colorations, les *C. albicans* par rapport, d'une part, aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* et, d'autre part, aux autres *Candida*, ainsi que les *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*.

20 L'on attend entre 36 et 60 heures et avantageusement sensiblement 48 heures, lorsque le milieu ne contient pas d'activateur ou d'inhibiteur.

30 L'on attend entre 18 et 30 heures et avantageusement sensiblement 24 heures, lorsque le milieu contient un activateur ou un inhibiteur.

35 Selon un premier mode de réalisation, ces procédés permettent d'identifier *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient :

- un substrat d'hexosaminidase, et/ou

- un substrat de glucosidase, et/ou
- un activateur d'hexosaminidase, et/ou
- inhibiteur d'hexosaminidase.

5 Selon un deuxième mode de réalisation, ces procédés permettent d'identifier *C. albicans* par rapport aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* et/ou aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient :

- un substrat d'hexosaminidase et un substrat de glucosidase, et/ou
- un activateur d'hexosaminidase, et/ou
- inhibiteur d'hexosaminidase.

10 Par "composé sélectivement inhibiteur de l'activité de l'hexosaminidase de *C. tropicalis*", on entend tout composé capable d'inhiber de manière sélective l'activité de l'hexosaminidase de *C. tropicalis*. Par exemple, les composés de type amide de formule décrite ci-dessus ont la propriété d'inhiber spécifiquement l'activité hexosaminidase des *C. tropicalis*, sans affecter celle des *C. albicans*.

15 Par "identification", on entend la détection et/ou la quantification.

20 Par "échantillon", on entend notamment tout prélèvement de type biologique, une souche ou un ensemble de souches de levure isolées par exemple après culture.

25 On expose ci-après, de manière générale la composition du milieu de culture, exprimée en g/l de milieu final.

Le milieu comprend une base nutritive nécessaire au développement des levures et des inhibiteurs spécifiques de l'hexosaminidase des *C. tropicalis* selon l'invention.

30 Les éléments constitutifs de la base nutritive comprennent :

35 - des peptones de 0,01 à 40 g/l, telles que la peptone de viande, le produit commercialisé par la société bioMérieux sous la marque bioSoyase ou analogue, ou encore un mélange de peptones ; de préférence, la peptone ou le mélange

de peptones est présent dans le milieu à environ 6 g/l ± 0,5 g/l ;

- un extrait de levure de 0,01 à 40 g/l, de préférence environ 1,5 g/l, apportant des vitamines de croissance des levures ;

- une source de carbone, telle que le glucose, le glycérol, un acétate, un pyruvate, un lactate, l'arginine, un aminobutyrate, ou un mélange de ces composants, dans la proportion de 0 à 10 g/l ; la source de carbone est de préférence le glucose en une quantité de 1 g/l ;

- un tampon ajouté au milieu afin d'obtenir un pH favorable pour le développement de *C. albicans*, compris entre 5 et 8,5 ; le tampon est choisi parmi les tampons phosphates, Tris, Hépès (acide N-2-hydroxyéthyl-pipérazine-N'-2-éthasulfonique) et citrate dans la proportion de 2,5 à 100 mM ; de préférence, le tampon est un tampon phosphate 10 mM pour ajuster le pH du milieu à une valeur voisine de 7 ;

- de l'Agar de 11 à 20 g/l, de préférence de 15 g/l.

Le substrat chromogène ou fluorogène peut être tout substrat chromogène ou fluorogène hydrolysable par une hexosaminidase, telle qu'une galactosaminidase, glucosaminidase ou mannosaminidase, pour libérer un produit coloré ou fluorescent. De préférence, le substrat est choisi parmi ceux présentant une forte coloration ou fluorescence avec peu de molécules, et n'induisant pas de modification du métabolisme des microorganismes, excepté pour l'activité enzymatique recherchée. Ces substrats sont de préférence choisis, pour les substrats chromogènes, parmi ceux comprenant un groupement chromophore tel qu'un indolyle substitué ou non, et notamment parmi le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-galactosaminide, 6-Chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide ou le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide de 20 à 600 mM, avantageusement le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-β-D-glucosaminide à 200 mM, et pour les substrats fluorogènes, parmi la 4-Méthumbelliféryl-N-acétyl-β-D-

galactosaminide, la 4-Méthumbelliféryl-N-acétyl-*b*-D-glucosaminide.

L'inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase des levures de l'espèce *C. tropicalis* est choisi préférentiellement dans le groupe des composés de type amide (I) ou leurs mélanges. Il est notamment choisi parmi les amides telles que la formamide, l'acétamide, la propionamide, la glycinamide, la succinamide, et autres. La quantité du composé de type amide est comprise entre 0,01 et 20 g/l. De préférence l'inhibiteur choisi est l'acétamide à 1 g/l.

Afin d'obtenir pour les levures de l'espèce *C. albicans* une activité intense et précoce, il peut avantageusement être ajouté au milieu de culture un activateur d'hexosaminidase tel que décrit dans le document FR-A-2.684.110. De même un inhibiteur ou un mélange d'inhibiteurs des bactéries, permettant d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif et de celles à Gram négatif, sans affecter celle des levures, et si possible des champignons, peut être ajouté au milieu. De préférence, les inhibiteurs de bactéries sont choisis dans le groupe des antibiotiques tels que gentamicine, chloramphénicol, pénicilline, streptomycine, cycloheximide, néomycine, tétracycline, oxytétracycline ou un mélange d'antibiotiques, et/ou parmi la tellurite, un molybdate et analogues, ou leurs mélanges. Avantageusement, on choisit le chloramphénicol (0,5 g/l), ou un mélange de gentamicine (0,1 g/l) et de chloramphénicol (0,05 g/l). Il est également possible d'inhiber la croissance des bactéries en diminuant le pH du milieu jusqu'à un pH acide.

Comme cela est démontré par les exemples ci-après, la réaction d'hydrolyse enzymatique reste spécifique au delà de 24 heures d'incubation.

Exemple 1 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet de l'acétamide sur l'activité hexosaminidase des levures.

Deux milieux ont été préparés selon les techniques habituelles. Le premier milieu ci-après désigné Milieu I contient tous les éléments de la base nutritive, ainsi qu'un substrat chromogène d'une hexosaminidase et un mélange inhibiteur de bactéries.

La composition du Milieu I pour un litre de milieu final est la suivante :

- bioSoyase (bioMérieux) ..... 6,0 g
- extrait de levure (bioMérieux) .... 1,5 g
- glucose (Merck) ..... 1,0 g
- tampon phosphate (Merck) ..... 10,0 mM
- Mn<sup>2+</sup> (Merck) ..... 1,0 mM
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-  
β-D-glucosaminide (Biosynth) ..... 0,1 g
- gentamicine ..... 0,1 g
- chloramphénicol ..... 0,05 g
- agar (bioMérieux) ..... 15,0 g

Le pH du milieu a été ajusté aux environs de 7.

Le second milieu appelé Milieu II correspond au milieu selon l'invention et contient tous les éléments ci-dessus décrits pour le Milieu I, plus l'inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase des *C. tropicalis*, c'est-à-dire un composé acétamide (Sigma) à 1,0 g.

Sur ces deux milieux, 12 souches de levures ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les souches provenant de la collection de la demanderesse, appartiennent aux espèces suivantes : *C. albicans* (3 souches), *C. glabrata* (2 souches), *C. krusei* (1 souche), *C. parapsilosis* (1 souche), *C. tropicalis* (3 souches), *Saccharomyces cerevisiae* (1 souche), *Trichosporon spp.* (1 souche). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations suivantes :

- les colonies bleues correspondent à des souches produisant la N-acétyl-β-D-glucosaminidase appartenant a priori à l'espèce *C. albicans* ;

- les colonies blanches correspondent aux souches ne produisant pas l'enzyme précitée ou dont cette enzyme est inhibée par le composé de type amide, elles appartiennent donc à d'autres espèces de levures qui seront alors à identifier à l'aide des techniques habituelles.

Les résultats sont présentés dans le tableau I ci-après :

TABLEAU I

| Espèces                | Milieu | Coloration  |        |       |             |        |       |
|------------------------|--------|-------------|--------|-------|-------------|--------|-------|
|                        |        | à 24 heures |        |       | à 48 heures |        |       |
|                        |        | Forte       | Faible | Nulle | Forte       | Faible | Nulle |
| <i>C. albicans</i>     | I      | 1*          | 2      | -     | 3           | -      | -     |
|                        | II     | 1           | 2      | -     | 3           | -      | -     |
| <i>C. glabrata</i>     | I      | -           | -      | 2     | -           | -      | 2     |
|                        | II     | -           | -      | 2     | -           | -      | 2     |
| <i>C. krusei</i>       | I      | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | II     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. parapsilosis</i> | I      | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | II     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. tropicalis</i>   | I      | -           | -      | 3     | 3           | -      | -     |
|                        | II     | -           | -      | 3     | -           | 1      | 2     |
| <i>S. cerevisiae</i>   | I      | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | II     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>Trichosporon</i>    | I      | -           | -      | 1     | 1           | -      | -     |
|                        | II     | -           | -      | 1     | 1           | -      | -     |

\* : nombre de souches, "--" = 0

Comme cela ressort du tableau I ci-dessus, l'apport du composé de type amide permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans*, ainsi qu'une souche de *Trichosporon* après 48 heures d'incubation uniquement, produisent des colonies colorées sur le milieu selon l'invention. Les colonies de *C. tropicalis* qui sont bleues après 48 heures sur le Milieu I donnent des colonies incolores sur le Milieu II, sauf une très faiblement colorée après 48 heures d'incubation.

#### Exemple 2 :

L'expérience de l'exemple 1 a été reproduite mais en utilisant des milieux liquides au lieu de milieux géliifiés.

Les milieux III et IV correspondent donc aux milieux I et II de l'exemple 1 mais sont dépourvus d'agar. Par ailleurs, la concentration du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-b-D-glucosaminide est de 150 mg/l de milieu final pour une utilisation en milieu liquide. Les milieux ont été répartis en ampoules en verre, à raison de 3 ml par ampoule. Les souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 1. Une suspension étalonnée à 2 MacFarland à l'aide d'un néphéломètre a été effectuée pour chacune des souches directement dans les ampoules contenant les milieux. Les ampoules ainsi inoculées ont été incubées 48 heures à 37°C. Elles ont été examinées après respectivement 24 et 48 heures selon les interprétations de l'exemple 1.

Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après :

TABLEAU II

| Espèces                | Milieu | Coloration  |        |       |             |        |       |
|------------------------|--------|-------------|--------|-------|-------------|--------|-------|
|                        |        | à 24 heures |        |       | à 48 heures |        |       |
|                        |        | Forte       | Faible | Nulle | Forte       | Faible | Nulle |
| <i>C. albicans</i>     | III    | 1*          | 2      | -     | 3           | -      | -     |
|                        | IV     | 1           | 2      | -     | 3           | -      | -     |
| <i>C. glabrata</i>     | III    | -           | -      | 2     | -           | -      | 2     |
|                        | IV     | -           | -      | 2     | -           | -      | 2     |
| <i>C. krusei</i>       | III    | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | IV     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. parapsilosis</i> | III    | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | IV     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. tropicalis</i>   | III    | -           | 2      | 1     | 3           | -      | -     |
|                        | IV     | -           | -      | 3     | -           | 2      | 1     |
| <i>S. cerevisiae</i>   | III    | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | IV     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>Trichosporon</i>    | III    | -           | -      | 1     | -           | 1      | -     |
|                        | IV     | -           | -      | 1     | -           | 1      | -     |

\* : nombre de souches, "-" = 0

Comme cela ressort du tableau II ci-dessus, l'apport du composé amidé permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet après 24 heures d'incubation, seules

les souches de *C. albicans* donnent des tubes colorés en bleu dans le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui donnent des tubes colorés dans le Milieu III donnent des tubes incolores dans le Milieu IV. Après 48 heures d'incubation la coloration des tubes comportant des souches de *C. tropicalis* est également inhibée ou au moins très fortement réduite.

**Exemple 3 :**

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet de l'acétamide sur l'activité hexosaminidase des levures en présence d'un activateur spécifique de cette enzyme.

L'expérience de l'exemple 1 a été reproduite mais en ajoutant au milieu de la N-Acétyl-glucosamine. Les milieux V et VI correspondent donc aux milieux I et II de l'exemple 1 auxquels on a ajouté de la N-Acétyl-glucosamine à 1,0 g/l de milieu final. Les souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 1. Elles ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations de l'exemple 1.

Les résultats sont présentés dans le tableau III ci-après :

TABLEAU III

| Espèces                | Milieu | Coloration  |        |       |             |        |       |
|------------------------|--------|-------------|--------|-------|-------------|--------|-------|
|                        |        | à 24 heures |        |       | à 48 heures |        |       |
|                        |        | Forte       | Faible | Nulle | Forte       | Faible | Nulle |
| <i>C. albicans</i>     | V      | 2*          | 1      | -     | 3           | -      | -     |
|                        | VI     | 2           | 1      | -     | 3           | -      | -     |
| <i>C. glabrata</i>     | V      | -           | -      | 2     | -           | -      | 2     |
|                        | VI     | -           | -      | 2     | -           | -      | 2     |
| <i>C. krusei</i>       | V      | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | VI     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. parapsilosis</i> | V      | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | VI     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. tropicalis</i>   | V      | -           | -      | 3     | 3           | -      | -     |
|                        | VI     | -           | -      | 3     | -           | -      | 3     |
| <i>S. cerevisiae</i>   | V      | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
|                        | VI     | -           | -      | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>Trichosporon</i>    | V      | -           | -      | 1     | 1           | -      | -     |
|                        | VI     | -           | -      | 1     | 1           | -      | -     |

5

\* : nombre de souches, "--" = 0

Comme cela ressort du tableau III ci-dessus, l'apport du composé de type amide permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans*, ainsi qu'une souche de *Trichosporon* après 48 heures d'incubation uniquement, produisent des colonies colorées sur le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui sont bleues sur le Milieu V donnent des colonies incolores sur le Milieu VI. L'ensemble de ces deux milieux permet donc également une identification spécifique des levures de l'espèce *C. tropicalis* puisqu'après 48 heures d'incubation, elles sont les seules à être positives sur le milieu V et négatives sur le milieu VI.

20

Exemple 4 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet d'un mélange de composés amidés sur l'activité hexosaminidase des levures en présence d'un activateur spécifique de cette enzyme.

L'expérience de l'exemple 3 a été reproduite mais en ajoutant au milieu VI de la formamide à 0,5 g/l de milieu final (milieu VIII), le milieu VII étant identique au milieu V de l'exemple 3. Les souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 3. Elles ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations de l'exemple 1.

10

Les résultats sont présentés dans le tableau IV ci-après :

TABLEAU IV

15

| Espèces                | Milieu | Coloration  |       |        |             |       |        |       |
|------------------------|--------|-------------|-------|--------|-------------|-------|--------|-------|
|                        |        | à 24 heures |       |        | à 48 heures |       |        |       |
|                        |        |             | Forte | Faible | Nulle       | Forte | Faible | Nulle |
| <i>C. albicans</i>     | VII    | 2*          |       | 1      | -           | 3     | -      | -     |
|                        | VIII   | 2           |       | 1      | -           | 3     | -      | -     |
| <i>C. glabrata</i>     | VII    | -           |       | -      | 2           | -     | -      | 2     |
|                        | VIII   | -           |       | -      | 2           | -     | -      | 2     |
| <i>C. krusei</i>       | VII    | -           |       | -      | 1           | -     | -      | 1     |
|                        | VIII   | -           |       | -      | 1           | -     | -      | 1     |
| <i>C. parapsilosis</i> | VII    | -           |       | -      | 1           | -     | -      | 1     |
|                        | VIII   | -           |       | -      | 1           | -     | -      | 1     |
| <i>C. tropicalis</i>   | VII    | -           |       | -      | 3           | 3     | -      | -     |
|                        | VIII   | -           |       | -      | 3           | -     | -      | 3     |
| <i>S. cerevisiae</i>   | VII    | -           |       | -      | 1           | -     | -      | 1     |
|                        | VIII   | -           |       | -      | 1           | -     | -      | 1     |
| <i>Trichosporon</i>    | VII    | -           |       | -      | 1           | 1     | -      | -     |
|                        | VIII   | -           |       | -      | 1           | -     | 1      | -     |

\* : nombre de souches, "—" = 0

Comme cela ressort du tableau IV ci-dessus, l'apport d'un second composé de type amide permet une détection encore plus spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans* produisent des colonies significativement colorées sur le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui sont bleues sur le Milieu VII donnent des colonies incolores sur le Milieu VIII et la souche

25

de *Trichosporon* fortement colorée après 48 heures d'incubation sur le milieu VII ne l'est plus que très faiblement sur le milieu VIII.

5

Exemple 5 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'intérêt de combiner un substrat d'hexosaminidase et un substrat de  $\beta$ -glucosidase dans des milieux pour l'isolement et l'identification des levures.

10 Au milieu I de l'exemple 1, il a été ajouté un substrat de  $\beta$ -glucosidase, le 6-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoside, à 0,07 g/l (milieu IX). A ce milieu, il a été ajouté soit un activateur d'hexosaminidase (N-Acétyl-glucosamine) à 1g/l (milieu X), soit un inhibiteur de l'hexosaminidase des *C. tropicalis* (Acétamide) à 1 g/l (milieu XI), soit une combinaison de l'activateur et l'inhibiteur précités aux mêmes concentrations (milieu XII).

20 Sur ces quatre milieux, dix-huit souches de levures ont été directement cultivées en boîtes de Pétri. Les souches, provenant de la collection de la demanderesse, appartiennent aux espèces suivantes : *C. albicans* (3 souches), *C. glabrata* (2 souches), *C. guilliermondii* (2 souches), *C. kefyr* (2 souches), *C. krusei* (1 souche), *C. lusitaniae* (2 souches), *C. parapsilosis* (1 souche), *C. tropicalis* (3 souches), *Saccharomyces cerevisiae* (1 souche), *Trichosporon spp.* (1 souche). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations suivantes :

30 - les colonies bleues correspondent à des souches produisant la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase appartenant a priori à l'espèce *C. albicans* ;

35 - les colonies roses correspondent à des souches produisant la  $\beta$ -D-glucosidase appartenant a priori aux espèces *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, et *C. tropicalis* ;

- les colonies mauves correspondent à des souches produisant les deux activités enzymatiques ;

5 - les colonies blanches correspondent aux souches ne produisant aucune des enzymes précitées ou dont ces enzymes sont inhibées, elles appartiennent donc à d'autres espèces de levures qui seront alors à identifier à l'aide des techniques habituelles.

Les résultats sont présentés dans le tableau V ci-après :

TABLEAU V

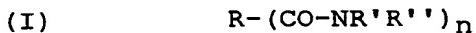
| Espèces                  | Milieu | Coloration  |         |       |             |        |       |
|--------------------------|--------|-------------|---------|-------|-------------|--------|-------|
|                          |        | à 24 heures |         |       | à 48 heures |        |       |
|                          |        | Forte       | Faible  | Nulle | Forte       | Faible | Nulle |
| <i>C. albicans</i>       | IX     | 1-bleue     | 2-bleue | -     | 3-bleue     | -      | -     |
|                          | X      | 2-bleue     | 1-bleue | -     | 3-bleue     | -      | -     |
|                          | XI     | 1-bleue     | 2-bleue | -     | 3-bleue     | -      | -     |
|                          | XII    | 2-bleue     | 1-bleue | -     | 3-bleue     | -      | -     |
| <i>C. glabrata</i>       | IX     | -           | -       | 2     | -           | -      | 2     |
|                          | X      | -           | -       | 2     | -           | -      | 2     |
|                          | XI     | -           | -       | 2     | -           | -      | 2     |
|                          | XII    | -           | -       | 2     | -           | -      | 2     |
| <i>C. guilliermondii</i> | IX     | -           | -       | 2     | 2-rose      | -      | -     |
|                          | X      | -           | -       | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
|                          | XI     | -           | -       | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
|                          | XII    | -           | -       | 2     | -           | 2-rose | 2     |
| <i>C. kefyr</i>          | IX     | -           | 2-rose  | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
|                          | X      | -           | 2-rose  | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
|                          | XI     | -           | 2-rose  | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
|                          | XII    | -           | 2-rose  | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
| <i>C. krusei</i>         | IX     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | X      | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XI     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XII    | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. lusitaniae</i>     | IX     | -           | -       | 2     | 1-rose      | 1-rose | 2     |
|                          | X      | -           | -       | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
|                          | XI     | -           | -       | 2     | 1-rose      | 1-rose | 2     |
|                          | XII    | -           | -       | 2     | 2-rose      | -      | 2     |
| <i>C. parapsilosis</i>   | IX     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | X      | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XI     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XII    | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>C. tropicalis</i>     | IX     | 2-rose      | 1-rose  |       | 2-mauve     | 1-rose | -     |
|                          | X      | 2-rose      | 1-rose  |       | 2-mauve     | 1-rose | 3     |
|                          | XI     | 2-rose      | 1-rose  |       | 3-rose      | -      | 3     |
|                          | XII    | 2-rose      | 1-rose  |       | 3-rose      | -      | 3     |
| <i>S. cerevisiae</i>     | IX     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | X      | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XI     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XII    | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
| <i>Trichosporon</i>      | IX     | -           | -       | 1     | 1           | -      | -     |
|                          | X      | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XI     | -           | -       | 1     | -           | -      | 1     |
|                          | XII    | -           | -       | 1     | -           | 1      | -     |

\* : nombre de souches-couleur des colonies, "--" = 0

5           Comme cela ressort du tableau V ci-dessus, l'apport d'une combinaison d'un substrat d'hexosaminidase et d'un substrat de  $\beta$ -glucosidase permet une détection d'un nombre plus important d'espèces de levure. En effet, il est possible sur les milieux selon l'invention de distinguer les souches de *C. albicans* d'une part, celles de *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, et *C. tropicalis* de l'autre, des autres espèces de levures. Les milieux X, XI et XII, illustre l'intérêt 10 d'associer cette combinaison de substrat à un activateur d'hexosaminidase, à un inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase des souches de *C. tropicalis* ou au mélange des deux. Sur le milieu X la détection des souches de *C. albicans* est plus rapide que sur le milieu IX, sur le milieu XI, la différence entre les souches de *C. albicans* et celles de *C. tropicalis* est plus nette et le milieu XII 15 combine les avantages des milieux X et XI.

**REVENDICATIONS**

1. Milieu de culture et d'identification spécifique de levures comprenant un substrat chromogène ou fluorogène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, caractérisé en ce que le milieu comprend en outre au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de *C. tropicalis*.
- 5 2. Milieu, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I):



15 dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

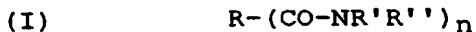
- un atome d'hydrogène,

- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

20 soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou égal à 1.

- 25 3. Milieu, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I) :



30

dans laquelle, premièrement, soit R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- un atome d'hydrogène,

- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, 35 aliphatique ou cyclique, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome,

soit chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

5 deuxièmement, n est un nombre entier supérieur ou égal à 1.

4. Milieu, selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I) :

10

(I)

 $R-(CO-NR'R'')_n$ 

dans laquelle, premièrement, R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres, constitués par :

- 15 - un atome d'hydrogène,  
- une chaîne hydrocarbonée aliphatique,  
et, deuxièmement, n est égal à 1 ou 2.

5. Milieu, selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une acétamide.

20 6. Milieu, selon les revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase de *C. albicans*.

7. Milieu, selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase est 25 la N-acétyl-glucosamine.

8. Milieu, selon les revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange de composés sélectivement inhibiteurs.

30 9. Milieu, selon la revendication 8, caractérisé en ce que le mélange de composés sélectivement inhibiteurs est constitué d'acétamide et de formamide.

10. Milieu, selon les revendications 1 et 9, caractérisé en ce que le milieu est gélifié et comprend pour 1 litre :

- 35 - peptones ou mélange de peptones 0,01-40 g  
- extrait de levure 0,01-40 g

- glucose (source de carbone) 0-10 g
- tampon phosphate (pH entre 5 et 8,5) 2,5-100 mM
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-  
β-D-glucosaminide (Biosynth) 20-600.10<sup>-6</sup> M
- 5 - acétamide (Sigma) 0,01-20 g
- inhibiteur de bactéries 0-20 g
- agar 11-20 g
- 11. Milieu selon les revendications 9 et 10 comprenant de plus de la N-acétyl-glucosamine à 1,0 g/l.
- 10 12. Milieu selon les revendications 10 et 12 comprenant de plus de la formamide à 0,5 g/l.
- 13. Milieu pour la détection et l'identification spécifique de levures, caractérisé par le fait qu'il comprend deux substrats, un premier substrat, chromogène ou fluorigène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, et un second substrat, chromogène ou fluorigène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des glucosidases.
- 14. Milieu, selon la revendication 13, dans lequel chaque substrat est constitué d'une partie spécifique de l'enzyme et d'une partie marqueur, caractérisé par le fait que la partie marqueur du premier substrat est différente de la partie marqueur du second substrat.
- 15. Milieu, selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisé par le fait qu'il comprend un activateur et/ou un inhibiteur d'hexosaminidase.
- 16. Milieu, selon la revendication 15, caractérisé par le fait que l'activateur est constitué par une hexosamine et/ou une hexosaminidine et/ou que l'inhibiteur reprend les caractéristiques de l'une quelconque des revendications 1 à 12.
- 17. Milieu, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisé par le fait que le substrat d'hexosaminidinase est constitué par un dérivé d'indoxyl et/ou que le substrat de glucosidase est constitué par un dérivé d'indoxyl.

18. Milieu, selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé par le fait que le milieu est liquide ou gélifié.

19. Procédé d'analyse microbiologique pour identifier 5 sélectivement la levure *C. albicans* et/ou *C. tropicalis* et/ou différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*, caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon à analyser au contact d'au moins un milieu d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

10 20. Procédé d'analyse microbiologique pour détecter et identifier sélectivement certaines espèces de levures *Candida*, caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon en contact avec un milieu selon l'une quelconque 15 des revendications 13 ou 18, que l'on attend que des colorations apparaissent dans le milieu et que l'on identifie, par des différences de colorations, les *C. albicans* par rapport, d'une part, aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* et, d'autre part, aux autres 20 *Candida*, ainsi que les *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* par rapport aux autres *Candida*.

21. Procédé, selon la revendication 20, caractérisé en que l'on attend entre 36 et 60 heures et avantageusement sensiblement 48 heures, lorsque le milieu ne contient pas 25 d'activateur ou d'inhibiteur selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16.

22. Procédé, selon la revendication 20, caractérisé en que l'on attend entre 18 et 30 heures et avantageusement sensiblement 24 heures, lorsque le milieu contient un 30 activateur ou un inhibiteur selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16.

23. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que l'on identifie *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae* et/ou *C. tropicalis* 35 par rapport aux autres *Candida*, lorsque le milieu contient :

- un substrat d'hexosaminidase, et/ou

- un substrat de glucosidase, et/ou
- un activateur d'hexosaminidase, et/ou
- inhibiteur d'hexosaminidase.

24. Procédé, selon l'une quelconque des  
5 revendications 20 à 23, caractérisé en ce que l'on identifie  
*C. albicans* par rapport aux *C. guilliermondii*, *C. kefyr*,  
*C. lusitaniae*, *C. tropicalis* et/ou aux autres *Candida*, lorsque  
le milieu contient :

- un substrat d'hexosaminidase et un substrat de  
10 glucosidase, et/ou
  - un activateur d'hexosaminidase, et/ou
  - inhibiteur d'hexosaminidase.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

|                              |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/FR 98/01717              |

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12Q1/04 C12Q1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A        | BENDEL C M ET AL: "Distinct mechanism of epithelial adhesion for Candida albicans and Candida tropicalis: Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 92 (4). 1993. 1840-1849. ISSN: 0021-9738, XP002064132<br>see the whole document<br>--- | 1                     |
| A        | MIRA-GUTIEREZ J ET AL: "Identification of yeast by hydrolysis of amides." MYCOSES 38 (3-4). 1995. 101-106. ISSN: 0933-7407, XP002064133<br>see the whole document<br>---<br>-/-   | 1                     |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 1998

Date of mailing of the international search report

14/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wells, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01717

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A        | CRIST A E JR ET AL: "Comparison of the MUREX C. albicans, albicans-sure, and BactiCard Candida test kits with the germ tube test for presumptive identification of Candida albicans." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 34 (10). 1996. 2616-2618. ISSN: 0095-1137, XP002064134<br>see the whole document | 1                     |
| A        | HEELAN J S ET AL: "Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of Candida albicans." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 34 (11). 1996. 2847-2849. ISSN: 0095-1137, XP002064135<br>see the whole document                           | 1                     |
| A        | GARCIA-MARTOS P ET AL: "Contribution to the knowledge of the enzymatic activity of yeasts of clinical interest." MYCOPATHOLOGIA 132 (1). 1995. 9-13. ISSN: 0301-486X, XP002064136<br>see the whole document   | 1                     |
| A        | US 5 120 718 A (GOLDMAN ROBERT C ET AL)<br>9 June 1992<br>see the whole document  | 1                     |
| A        | FR 2 659 982 A (SERBIO) 27 September 1991<br>see the whole document   | 1                     |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/FR 98/01717

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)          |  | Publication date   |
|--|------------------|----------------------------------|--|--|
| US 5120718                             | A<br>09-06-1992  | NONE                             |  |  |
| FR 2659982                             | A<br>27-09-1991  | DE<br>DE<br>EP<br>WO<br>JP<br>US | 69120359 D<br>69120359 T<br>0476107 A<br>9114787 A<br>4506753 T<br>5449612 A | 25-07-1996<br>16-01-1997<br>25-03-1992<br>03-10-1991<br>26-11-1992<br>12-09-1995 |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 98/01717

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12Q1/04 C12Q1/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| A         | BENDEL C M ET AL: "Distinct mechanism of epithelial adhesion for Candida albicans and Candida tropicalis: Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 92 (4). 1993. 1840-1849. ISSN: 0021-9738, XP002064132<br>voir le document en entier<br>--- | 1                             |
| A         | MIRA-GUTIEREZ J ET AL: "Identification of yeast by hydrolysis of amides." MYCOSES 38 (3-4). 1995. 101-106. ISSN: 0933-7407, XP002064133<br>voir le document en entier<br>---<br>-/-   | 1                             |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/12/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Wells, A

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale No  
PCT/FR 98/01717

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| A   | CRIST A E JR ET AL: "Comparison of the MUREX C. albicans, albicans-sure, and BactiCard Candida test kits with the germ tube test for presumptive identification of Candida albicans." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 34 (10). 1996. 2616-2618. ISSN: 0095-1137, XP002064134<br><u>voir le document en entier</u><br>--- | 1                             |
| A   | HEELAN J S ET AL: "Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of Candida albicans." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 34 (11). 1996. 2847-2849. ISSN: 0095-1137, XP002064135<br><u>voir le document en entier</u><br>---                           | 1                             |
| A   | GARCIA-MARTOS P ET AL: "Contribution to the knowledge of the enzymatic activity of yeasts of clinical interest." MYCOPATHOLOGIA 132 (1). 1995. 9-13. ISSN: 0301-486X, XP002064136<br><u>voir le document en entier</u><br>---   | 1                             |
| A   | US 5 120 718 A (GOLDMAN ROBERT C ET AL)<br>9 Juin 1992<br><u>voir le document en entier</u><br>---  | 1                             |
| A   | FR 2 659 982 A (SERBIO) 27 septembre 1991<br><u>voir le document en entier</u><br>-----   | 1                             |

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Ir ationale No

PCT/FR 98/01717

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)  | Date de<br>publication   |
|---|------------------------|--|--|
| US 5120718 A                                    | 09-06-1992             | AUCUN  |  |
| FR 2659982 A                                    | 27-09-1991             | DE 69120359 D<br>DE 69120359 T<br>EP 0476107 A<br>WO 9114787 A<br>JP 4506753 T<br>US 5449612 A | 25-07-1996<br>16-01-1997<br>25-03-1992<br>03-10-1991<br>26-11-1992<br>12-09-1995 |